



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111044734 A

(43)申请公布日 2020.04.21

(21)申请号 201911393099.5

(22)申请日 2019.12.30

(71)申请人 上海复星长征医学科学有限公司
地址 200444 上海市宝山区城银路830号

(72)发明人 郭健健

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 顾艳哲

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

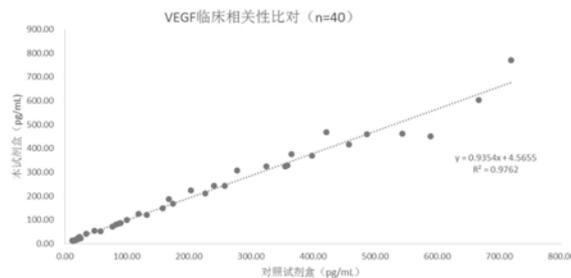
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒及其制备方法和使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒及其制备方法和使用方法,本发明试剂盒包括生物素化VEGF单克隆抗体,碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体,链霉亲和素磁珠,试剂盒适用于全自动化学发光免疫分析仪 Lumiart-II-1,相比传统的ELISA试剂盒,全自动化操作减少手工误差,反应时间更短,灵敏度更高,实现高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率有了较大的提升,试剂盒可用于早期癌症风险筛查,肿瘤病人治疗疗效评估监测以指导用药、复发监测和预后等,具有良好的应用前景。



1. 一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒,其特征在于,包括生物素化VEGF单克隆抗体、碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体以及链霉亲和素磁珠。

2. 根据权利要求1所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒,其特征在于,所述的生物素化VEGF单克隆抗体中,VEGF单克隆抗体与生物素的摩尔质量比为1:45-55。

3. 根据权利要求1所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒,其特征在于,所述的碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体中,VEGF单克隆抗体与碱性磷酸酶标记物的质量比为1:1-2。

4. 根据权利要求1所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒,其特征在于,所述链霉亲和素磁珠的粒径为0.5-1.5微米。

5. 一种如权利要求1所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:

将生物素和VEGF单克隆抗体溶解于溶剂中,用脱盐柱脱盐处理,得到生物素化VEGF单克隆抗体;

用高碘酸钠法将碱性磷酸酶和VEGF单克隆抗体进行偶联,用脱盐柱脱盐处理,得到碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述生物素化VEGF单克隆抗体的具体制备方法为:

取VEGF单克隆抗体,用PBS缓冲液稀释,称取生物素用DMSO溶解,将二者室温混匀,用离心脱盐柱脱盐处理,收集离心管中的液体至保存管中得到生物素化VEGF单克隆抗体。

7. 根据权利要求5所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体的具体制备方法为:

(1) 取碱性磷酸酶,用纯化水配制成溶液,加入等体积的高碘酸钠纯化水溶液,低温避光反应一段时间;

(2) 加入与碱性磷酸酶溶液等体积的乙二醇溶液,低温避光反应一段时间,加入VEGF单克隆抗体,用离心脱盐柱脱盐处理,收集离心管中的液体;

(3) 加入硼氢化钠溶液,低温避光反应一段时间,加入饱和硫酸铵溶液,再低温避光反应一段时间,离心,弃去上清,得到沉淀物;

(4) 取沉淀物PBS溶解,用离心脱盐柱脱盐处理,收集离心管中的液体,得到碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体。

8. 根据权利要求6或7所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,用PD SpinTrap G-25离心脱盐柱进行脱盐处理,脱盐过程中先用PBS预处理脱盐柱;

得到生物素化VEGF单克隆抗体或碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体,加入甘油混匀,于低于-20℃下保存。

9. 根据权利要求7所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的制备方法,其特征在于,

步骤(1) 碱性磷酸酶浓度为10mg/mL;高碘酸钠浓度为12.8mg/mL;低温避光反应的温度为4℃,反应时间为0.5小时;

步骤(2) 乙二醇溶液为体积比1%的乙二醇溶液;低温避光反应的温度为4℃,反应时间

为45分钟；

步骤(3)按每毫克抗体加入20 μ L的量加入硼氢化钠溶液,所述硼氢化钠溶液的浓度为5mg/mL,低温避光反应的温度为4 $^{\circ}$ C,反应时间为2小时。

10.一种如权利要求1所述的一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的使用方法,其特征在于,以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,在反应杯中依次加入样品、生物素化VEGF单克隆抗体、碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体,反应一段时间,再加入链霉亲和素磁珠,反应一段时间,进行磁分离,清洗液清洗数次,将反应杯送入暗室,加入化学发光底物液进行发光反应,并记录发光值。

一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试剂盒,具体涉及一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 肿瘤细胞的生长、发展和转移是多因素、多阶段的,涉及肿瘤细胞与宿主之间错综复杂的关系,机理尚不明确。近年来的研究发现,新的血管的生成与肿瘤发展,转移有密切联系。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)是一种具有高度生物活性的功能性的信号转导蛋白,它能作用于血管内皮细胞,使其增殖、迁移、管腔形成,参与血管生成并使毛细血管通透性增加,导致肿瘤血管异常生长,阻碍抗肿瘤药物有效输送至肿瘤组织内,并可刺激新生血管生长因子增加。VEGF在几乎所有的实体肿瘤患者血液中的表达均比健康人群增高,是近年来研究较多的一种全新的广谱肿瘤标记物,对于血液中VEGF高表达的受检者,可以根据受检者体征,针对性地与其它肿瘤标志物联合筛查,一方面能大幅度提高检出率,另一方面可以确定某些肿瘤组织来源。

[0003] VEGF相对分子量为45kDa,是高度糖基化的碱性蛋白,两个相同的亚单位通过二硫键结合而成,由于外显子剪切的不同而形成不同的亚型,VEGF至少有五种不同的亚型,根据氨基酸的数目命名为:VEGF121,VEGF145,VEGF165,VEGF189,VEGF206。其中VEGF121,VEGF145,VEGF165是分泌性可溶性蛋白,直接作用于血管内皮细胞促进血管内皮增殖,增加血管通透性,VEGF165是VEGF的主要存在形式。

[0004] 近年来,各种免疫分析技术的研究和应用发展迅速,广泛应用于临床疾病的辅助诊断等。目前用于检测人血清VEGF的方法主要是酶联免疫吸附法,但其检测灵敏度较低,检测范围窄,精确度不高,操作较为繁琐等。

发明内容

[0005] 本发明的目的就是为了解决上述问题而提供一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒及其制备方法和使用方法,该试剂盒灵敏度高,特异性强,结果准确,使用简便。

[0006] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

[0007] 一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒,包括生物素化VEGF单克隆抗体、碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体以及链霉亲和素磁珠。

[0008] 优选地,所述的生物素化VEGF单克隆抗体中,VEGF单克隆抗体与生物素的摩尔质量比为1:45-55。

[0009] 优选地,所述的碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体中,VEGF单克隆抗体与碱性磷酸酶标记物的质量比为1:1-2。

[0010] 优选地,所述链霉亲和素磁珠的粒径为0.5-1.5微米。

[0011] 一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的制备方法,包括:

[0012] 将生物素和VEGF单克隆抗体溶解于溶剂中,用脱盐柱脱盐处理,得到生物素化VEGF单克隆抗体;

[0013] 用高碘酸钠法将碱性磷酸酶和VEGF单克隆抗体进行偶联,用脱盐柱脱盐处理,得到碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体。

[0014] 优选地,所述生物素化VEGF单克隆抗体的具体制备方法为:

[0015] 取VEGF单克隆抗体,用PBS缓冲液稀释,称取生物素用DMSO溶解,将二者室温混匀,用离心脱盐柱脱盐处理,收集离心管中的液体至保存管中得到生物素化VEGF单克隆抗体。

[0016] 优选地,所述碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体的具体制备方法为:

[0017] (1) 取碱性磷酸酶,用纯化水配制成溶液,加入等体积的高碘酸钠纯化水溶液,低温避光反应一段时间;

[0018] (2) 加入与碱性磷酸酶溶液等体积的乙二醇溶液,低温避光反应一段时间,加入VEGF单克隆抗体,用离心脱盐柱脱盐处理,收集离心管中的液体;

[0019] (3) 加入硼氢化钠溶液,低温避光反应一段时间,加入饱和硫酸铵溶液,再低温避光反应一段时间,离心,弃去上清,得到沉淀物;

[0020] (4) 取沉淀物PBS溶解,用离心脱盐柱脱盐处理,收集离心管中的液体,得到碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体。

[0021] 优选地,用PD SpinTrap G-25离心脱盐柱进行脱盐处理,脱盐过程中先用PBS预处理脱盐柱;

[0022] 得到生物素化VEGF单克隆抗体或碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体,加入甘油混匀,于低于 -20°C 下保存。

[0023] 优选地,步骤(1)碱性磷酸酶浓度为 $10\text{mg}/\text{mL}$;高碘酸钠浓度为 $12.8\text{mg}/\text{mL}$;低温避光反应的温度为 4°C ,反应时间为0.5小时;

[0024] 步骤(2)乙二醇溶液为体积比1%的乙二醇溶液;低温避光反应的温度为 4°C ,反应时间为45分钟;

[0025] 步骤(3)按每毫克抗体加入 $20\mu\text{L}$ 的量加入硼氢化钠溶液,所述硼氢化钠溶液的浓度为 $5\text{mg}/\text{mL}$,低温避光反应的温度为 4°C ,反应时间为2小时。

[0026] 一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒的使用方法,以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,在反应杯中依次加入样品、生物素化VEGF单克隆抗体、碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体,反应一段时间,再加入链霉亲和素磁珠,反应一段时间,进行磁分离,清洗液清洗数次,将反应杯送入暗室,加入化学发光底物液进行发光反应,并记录发光值。反应原理是样本中的VEGF和碱性磷酸酶标记的抗体及生物素化抗体结合,形成抗体-抗原-抗体-酶复合物,复合物与磁珠结合。然后,使用磁性分离器将磁珠进行分离并去除未和固相磁珠结合的成分。最后,加入化学发光底物,已与固相结合碱性磷酸酶会促使底物发出光子,其发光强度与样本中VEGF的含量成正比,通过校准曲线计算出样本中VEGF的含量。

[0027] 本试剂盒和传统的ELISA试剂盒相比,有以下几个显著的优点。

[0028] 本试剂盒采用链霉亲和素磁性微球作为固相载体,链霉亲和素分子由4条相同的肽链组成,其中每条肽链都能结合一个生物素,因此一个链霉亲和素分子能高度特异性地结合4个生物素分子,当生物素化抗体-抗原-抗体-酶复合物和磁珠结合,通过激发底物发出光子,可以将微量抗原的信号放大成千上万倍,灵敏度较ELISA法有显著提升。

[0029] 生物素化抗体的制备和碱性磷酸酶标记抗体的制备流程简单,标记工艺稳定,制备得到的偶联物结构稳定且效价更高,单个测试所需的成本更低。

[0030] ELISA在显色时,由于底物与终止液加入有先后时间差异,会不可避免的产生因显色时间不一致导致的数据差异,本试剂盒使用的化学发光底物液在碱性条件下非酶解性水解程度低,即本底低,热稳定性好,在15min时强度达到高峰,15-60min内光信号强度维持一致,变化很小,即使在12h后仍能测定得出正确结果。

[0031] 本试剂盒检测一个样本的时间为25分钟,相比ELISA方法的2.5小时,极大地提高了检测效率。

[0032] 与现有技术相比,本发明试剂盒适用于全自动化学发光免疫分析仪Lumiart-II-1,相比传统的ELISA试剂盒,全自动操作减少手工误差,反应时间更短,灵敏度更高,实现高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率有了较大的提升,试剂盒可用于早期癌症风险筛查,肿瘤病人治疗疗效评估监测以指导用药、复发监测和预后等,具有良好的应用前景。

附图说明

[0033] 图1为本发明实施例检测试剂盒的制备方法流程图;

[0034] 图2为本发明实施例3试剂盒校准曲线(校准品浓度为横坐标,RLU为纵坐标);

[0035] 图3为本发明实施例4试剂盒和北京健平金星的酶联免疫吸附法试剂盒测定40例临床血清的结果比较。

具体实施方式

[0036] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0037] 实施例1

[0038] 血管内皮生长因子定量检测试剂盒的制备,具体流程如图1。

[0039] (1)生物素化VEGF单克隆抗体的制备

[0040] 取0.1mg的VEGF单克隆抗体,用PBS缓冲液稀释至1mg/mL,称取1mg生物素用DMSO溶解,浓度为10mmol/L,按照抗体和生物素1:50的摩尔质量比进行混合,室温混匀30分钟,用PD SpinTrap G-25离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中,首先用PBS预处理脱盐柱,最后加入得到的生物素化VEGF单克隆抗体溶液,收集离心管中的液体至保存管中得到生物素化VEGF单克隆抗体,加入等体积的甘油,混匀,-20℃保存。

[0041] (2)碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体

[0042] 取0.2mg碱性磷酸酶(ALP),用纯化水配制成10mg/mL的浓度,加入与ALP溶液等体积的高碘酸钠(12.8mg/mL,纯化水溶解,现配现用),4℃避光反应30分钟。加入与ALP溶液等体积的1%乙二醇溶液(现用现配),4℃避光反应45分钟。加入0.1mg抗体混合,用PD SpinTrap G-25离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先用PBS预处理脱盐柱,收集离心管中的混合液,按每毫克抗体20 μ l的量加入硼氢化钠溶液(5mg/mL,纯化水溶解,现配现用),4℃避光反应2小时。缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4℃反应2小时。离心(4℃,8000rpm,30分钟),弃去上清。沉淀用适量PBS溶解,用PD SpinTrap G-25离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先用PBS预处理脱盐柱,收集离心管中的液体,加入等体积的甘油,混匀,-20℃保存。

[0043] (3) 血管内皮生长因子校准品和质控品的制备

[0044] 用校准品和质控品缓冲液(50mM Tris,1%BSA,0.9%NaCl,pH7.4),将血管内皮生长因子抗原配制成浓度为0pg/mL,5pg/mL,25pg/mL,125pg/mL,250pg/mL,1000pg/mL的校准品,浓度为150pg/mL,500pg/mL的质控品。

[0045] 实施例2

[0046] 血管内皮生长因子定量检测方法

[0047] 以全自动化学发光免疫分析仪(Lumiart-II-1)为检测工具,检测原理为双抗体夹心法,在一次性反应杯中,仪器依次加入50 μ L样品,50 μ L生物素化VEGF单克隆抗体,50 μ L碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体,反应15分钟,再加入25 μ L链霉亲和素磁珠,反应5分钟,进行磁分离,清洗液清洗5次,机械臂将反应杯送入暗室,加入200 μ L化学发光底物液(APS-5)进行发光反应,最后记录发光值。

[0048] 实施例3

[0049] 血管内皮生长因子磁微粒化学发光免疫检测试剂盒性能评价

[0050] 采用实施例2中的方法对VEGF校准品进行检测,绘制标准曲线如图2所示。

[0051] 灵敏度的检测:参照CLSI EP17-A文件推荐实验方案,计算血管内皮生长因子磁微粒化学发光免疫检测试剂盒的灵敏度,得到的灵敏度为2pg/mL。

[0052] 线性的检测:对浓度为3.91pg/mL,7.81pg/mL,15.63pg/mL,31.25pg/mL,62.5pg/mL,125pg/mL,250pg/mL,500pg/mL,1000pg/mL的血管内皮生长因子做线性分析,计算线性相关系数, $r=0.9996$,试剂盒的线性检测范围为3.91-1000pg/mL。

[0053] 精密度检测:取浓度为的VEGF质控品,每个浓度各做10个平行,用三批试剂盒检测,计算试剂盒批内和批间精密度,结果表明批内和批间精密度均小于5%。

[0054] 抗干扰性能:取混合血清,分别添加干扰物质,包括10mg/dL胆红素,125mg/dL血红蛋白,2000mg/dL甘油三脂,添加比例按照1:20进行,分别测定混和血清及添加了各种干扰物质后混合血清的测值,计算两者之间的偏差,以 $\pm 10\%$ 为可接受范围,结果表明,抗干扰性能均符合要求。

[0055] 校准品溯源:将VEGF的WHO标准品(VEGF165,NIBSC code:02/286)复溶后,用PBS倍比稀释出对应校准品的5个浓度点5pg/mL,25pg/mL,125pg/mL,250pg/mL,1000pg/mL,以工作校准品为准,将此系列标准品用化学发光法检测各点实际浓度值,计算线性相关系数 $r=0.9991$,实际浓度值与标示值比值均在0.9-1.1之间。

[0056] 实施例4

[0057] 血管内皮生长因子检测试剂盒的对比实验

[0058] 分别用本发明试剂盒和传统的酶联免疫吸附法试剂盒检测40例临床血清,通过线性相关分析,如图3,结果证明,两者测定值无显著差异,相关性 $r=0.97$,在临床符合率方面有很好的一致性,从表1比较结果看,本试剂盒的灵敏度,检测范围均优于酶联免疫法试剂盒,且操作更加简便,检测时间更短。

[0059] 表1本试剂盒与已上市同类产品的比较

	本试剂盒	健平金星
[0060] 方法学	磁微粒化学发光法	酶联免疫吸附法
检测原理	双抗夹心法	双抗夹心法
标记物	碱性磷酸酶	辣根过氧化物酶
灵敏度	2pg/mL	6.25pg/mL
检测范围	3.91-1000pg/mL	6.25-400pg/mL
发光底物	APS-5	TMB
检测时间	25 分钟	2.5 小时

[0061] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

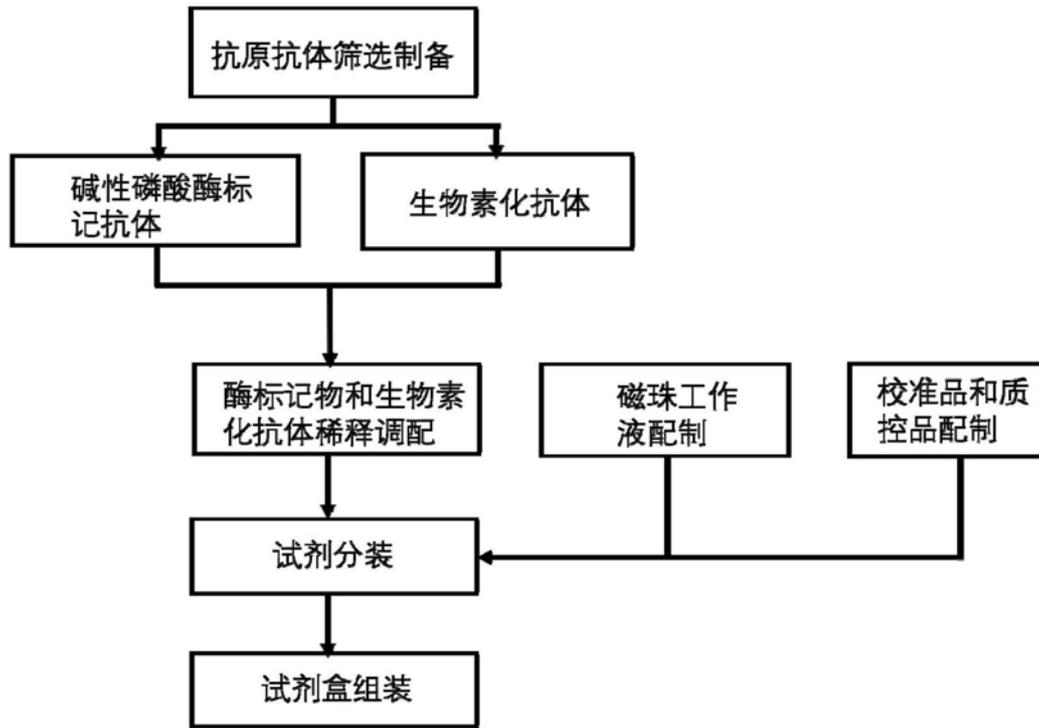


图1

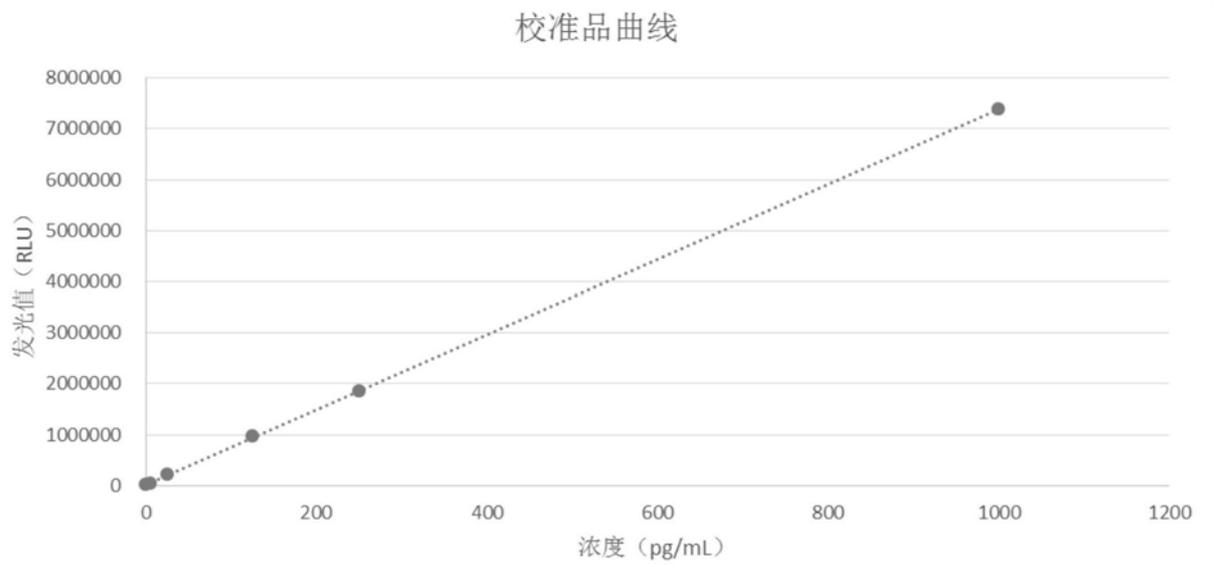


图2

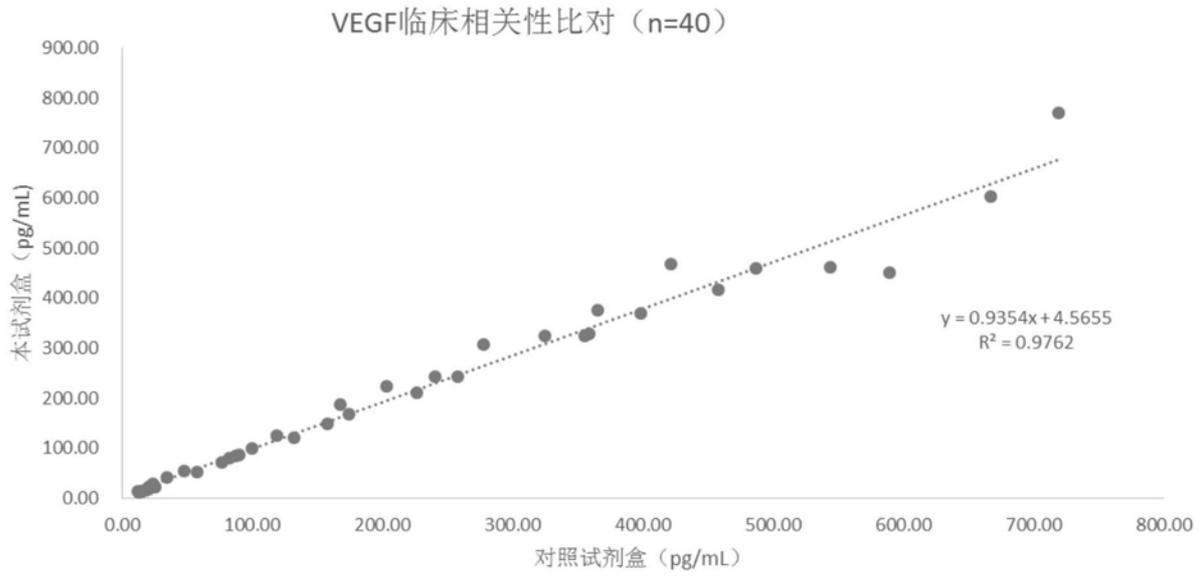


图3

专利名称(译)	一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN111044734A	公开(公告)日	2020-04-21
申请号	CN2019111393099.5	申请日	2019-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海复星长征医学科学有限公司		
[标]发明人	郭健健		
发明人	郭健健		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/57484 G01N33/577 G01N33/6893 G01N2333/475		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测血管内皮生长因子的检测试剂盒及其制备方法和使用方法，本发明试剂盒包括生物素化VEGF单克隆抗体，碱性磷酸酶标记的VEGF单克隆抗体，链霉亲和素磁珠，试剂盒适用于全自动化学发光免疫分析仪Lumiart-II-1，相比传统的ELISA试剂盒，全自动化操作减少手工误差，反应时间更短，灵敏度更高，实现高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率有了较大的提升，试剂盒可用于早期癌症风险筛查，肿瘤病人治疗疗效评估监测以指导用药、复发监测和预后等，具有良好的应用前景。

